

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2017.16299

星斑川鲷雌核发育二倍体、单倍体与普通二倍体及杂交胚胎发育的比较

段会敏^{1,2}, 田永胜^{1,3}, 李文龙^{1,3}, 李振通^{1,2}, 陈张帆^{1,3}, 唐江^{1,2},
成美玲^{1,4}, 郭华^{1,2}, 孙宗哲⁵, 陈松林^{1,3}

1. 中国水产科学院 黄海水产研究所, 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室, 山东 青岛 266071;
2. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306;
3. 青岛海洋科学与技术国家实验室, 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东 青岛 266273;
4. 大连海洋大学 水产与生命学院, 辽宁 大连 116023;
5. 蓬莱市宗哲水产养殖公司, 山东 蓬莱 265617

摘要: 通过紫外线(UV)对冷冻的鲈(*Lateolabrax japonicus*)精子进行灭活, 利用冷休克和压力休克方法诱导星斑川鲷(*Platichthys stellatus*)雌核发育二倍体, 同时利用灭活鲈精子制备单倍体胚胎, 未灭活鲈精子受精制备杂交胚胎, 星斑川鲷精子受精制备正常发育胚胎。对以上几种胚胎发育时序、发育生物学特征进行了观察比较。结果表明, 卵裂期单倍体、杂交二倍体和雌核发育二倍体胚胎发育速度与普通二倍体胚胎没有明显差异, 从低囊胚期开始各实验组胚胎发育速度均慢于普通二倍体胚胎; 杂交胚胎在胚体形成期基本死亡, 单倍体胚胎在尾芽期停止发育死亡, 均不能正常孵出。雌核发育二倍体与普通二倍体具有相似的发育时序, 普通二倍体 100 h 10 min 孵化出膜, 而雌核发育二倍体 104 h 50 min 孵化出膜。雌核发育胚体畸形率(53.59±0.36)%, 孵化率(0.11±0.01)%; 普通二倍体胚体畸形率(35.11±6.19)%, 孵化率(58.01±5.30)%; 与普通二倍体相比, 雌核发育二倍体胚体畸形率高, 孵化率低, 但孵化鱼苗能够正常发育, 获得了雌核发育群体。本研究为星斑川鲷雌核发育提供了技术方法, 同时为单倍体、杂交和雌核发育胚胎的发育生物学研究提供了细胞生物学证据。

关键词: 星斑川鲷; 雌核发育; 单倍体; 杂交胚胎; 胚胎发育

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2017)03-0477-11

星斑川鲷(*Platichthys stellatus*)又称星突江鲷, 隶属鲷形目(Pleuronectiformes)、鲷科(Pleuronectidae)、川鲷属, 分布在中国、朝鲜、韩国、日本、俄罗斯及美国太平洋沿岸海域, 在中国吉林省的图们江也有分布^[1]。其对水温和盐度的变化具有较强的适应能力, 抗病力强, 耐运输, 且繁殖能力强, 具有较高的经济价值, 适宜进行集约化养殖^[2]。是继半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)和牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)之后具有较高商业开发价值的水产养殖鱼类之一。

星斑川鲷雌雄个体生长差异较大, 2~3 龄雌性体重为雄性的 2.48 倍^[3], 研究星斑川鲷性别控制技术, 繁育全雌性化的苗种对于提高养殖经济效益具有重要的意义。雌核发育是一种控制鱼类性别的有效方法, 是建立全雌性后代繁育群体最直接和有效的技术手段, 胚胎发育生物学研究对于染色体组操作技术方法的制定具有重要意义。在海水鱼类染色体操作育种技术研究中, 已经对半滑舌鲷^[4]、大菱鲆^[5]、漠斑牙鲆(*P. lethostigma*)^[6]等海水鱼类雌核发育技术进行了研究, 并对其雌核发育二倍体、单倍体胚

收稿日期: 2016-10-11; 修订日期: 2017-01-19.

基金项目: 青岛市南区科技发展资金项目(2015-6-023-ZH); 青岛海洋科学与技术国家实验室鳌山科技创新计划项目(2015ASKJ02).

作者简介: 段会敏(1991-), 女, 硕士研究生, 研究方向为动物遗传育种与繁殖研究. E-mail: dhmmn@qq.com

通信作者: 田永胜, 研究员, 博士, 研究方向为鱼类遗传育种. E-mail: tianys@ysfri.ac.cn

胎的发育特征进行观察,同时培育出了雌核发育后代,为以上鱼类性别决定类型的判别及雌性化育种技术的研究提供了有力的支持。国内外有关星斑川鲷的研究主要集中在种群资源量^[7]、胚胎发育^[8]、遗传育种^[9-11]等方面,在遗传基础方面,国内外学者利用同工酶和微卫星标记对星斑川鲷野生群体或养殖群体的遗传结构进行了分析^[12],对生理相关基因的克隆和表达特性^[13]、染色体核型^[14]、精子冷冻保存与生理特性^[15]、免疫相关组织抗菌活性^[16]等进行了研究。另外建立了星斑川鲷家系并对后代遗传性状进行分析^[3],对星斑川鲷与圆斑星鲷(*Verasper variegates*)、条斑星鲷(*V. moseri*)远缘杂交的可能性进行探索研究^[17]。但国内外关于星斑川鲷雌核发育诱导及胚胎发育过程尚未见相关研究报道。本研究利用精子冷冻库中保存的鲈精子诱导获得了星斑川鲷雌核发育胚胎,对其发育时序和发育生物学特征进行了观察研究,同时对单倍体、杂交二倍体和普通二倍体的胚胎发育进行了观察比较,以便充分解析星斑川鲷胚胎发育规律,以及异源精子对胚胎发育的影响,为星斑川鲷染色体操作育种、性别控制,以及全雌性化育种群体的制备提供依据。

1 材料与方法

1.1 星斑川鲷亲鱼准备和卵子的采集

实验采用的亲鱼由蓬莱宗哲水产养殖有限公司提供,年龄 3 龄以上,选取性腺已经开始发育、无病害的个体。在循环水养殖车间养殖,进行生殖调控。当水温达到 12~13℃ 时,雌鱼性腺开始发育。选取性腺发育较好,性腺从腹部到体后部均有较大程度隆起的雌鱼,对发育迟缓的雌鱼注射促黄体素释放激素类似物(LRH-A2)10 μg/kg,48 h 后人工挤卵,收集卵子放在烧杯中等待受精。

1.2 异源精子来源

实验用鲈雄鱼养殖在海阳市黄海水产有限公司,鲈的精液为 2015 年冷冻保存,当养殖水温降至 18℃ 时,利用人工挤压腹部法收集雄鱼精液,并用 MPRS 稀释配制 20% DMSO 作为精子冷冻保存液^[18],冷冻保存鲈精子,冷冻精子贮存在液氮中。

MPRS 稀释液配制:取葡萄糖 11.01 g, NaCl 3.53 g, NaHCO₃ 0.25 g, NaH₂PO₄ 0.22 g, KCl 0.39 g, CaCl₂·2H₂O 0.17 g, MgCl₂·6H₂O 0.23 g 定溶于 1000 mL 蒸馏水中,高温灭菌,待用。

1.3 鲈精子的灭活及授精

取冻存鲈精子,在 37℃ 水浴中快速解冻,镜检精子的活率,达 70% 以上的精液方可用于实验。每 200 μL 冷冻精子用 1 mL 的 MPRS 溶液稀释,平铺于直径为 9 cm 的培养皿中,采用 80 mJ/cm² 剂量紫外线灭活,经紫外线照射后的灭活精子立刻倒入盛有新鲜星斑川鲷卵的烧杯中,按 1 mL 精子/100 mL 卵的比例进行人工授精,添加 2 倍体积于受精卵的海水,海水温度 14℃,静置数分钟使其充分受精。

1.4 单倍体制备

利用灭活的鲈精子与星斑川鲷卵受精(杂交),受精 5 min 后将卵盛在 80 目的纱网袋中,利用海水漂洗受精卵,以便除去多余的精液和黏液,之后将卵盛在烧杯中静置,分离受精卵和下沉死卵,将上浮受精卵放在 50 cm×50 cm×100 cm 网箱中孵化,海水温度保持在 13~14℃,同时利用气石给网箱中微充气,溶氧量保持在 5.0~9.0 mg/L,利用显微镜进行胚胎发育观察。

1.5 杂交二倍体制备

鲈冷冻精液解冻之后和星斑川鲷的卵以体积比为 1:100 进行人工干法授精,利用前述相同方法清洗受精卵,取上浮卵放于网箱中,置于 13~14℃ 海水中培养,溶氧量保持在 5.0~9.0 mg/L,利用显微镜进行胚胎发育的观察。

1.6 雌核发育二倍体制备

采用静水压法制备雌核发育二倍体:利用灭活的鲈精子与星斑川鲷卵“受精”,在受精 3 min 左右,将受精卵注入清洗干净并有少许海水的静水压仪中,再加入适量海水,盖上塞子后,挤出压力缸中的空气,置于压力机上,在受精 5 min 时快速人工加压 60 Pa,维持 10 min,采用慢速减压的方法,拧动减压阀进行减压,将卵倒入预先准备好的烧杯中,按照相同的方法进行洗卵,取上浮卵放于网箱中,置于 13~14℃ 海水中培养,溶氧量保持在 5.0~9.0 mg/L,利用显微镜观察胚胎发育。

1.7 普通二倍体制备

利用星斑川鲷的新鲜精子与星斑川鲷的卵以体积比为 1:100 的比例进行人工干法授精,受精 5 min 后利用相同方法对受精卵进行清洗,除去死卵,培养上浮卵作为对照组,同时利用显微镜进行胚胎发育的观察。

1.8 星斑川鲷的胚胎发育观察

分别在胚胎发育到卵裂期、囊胚期、原肠期、神经胚期、胚体形成期、尾芽期、心跳期、出膜前期、出膜期、初孵仔鱼期, 取受精卵置于培养皿中, 加几滴海水, 在 Olympus 显微镜下连续观察胚胎发育情况, 用 Olympus 照相机拍摄胚胎发育特征图片。统计各种胚胎的发育进程, 记录胚胎的发育特征。

1.9 受精率、畸形率和孵化率的统计和数据处理

每个实验组设3个重复, 每次实验均取30粒受精卵进行胚胎发育观察, 胚胎的发育时序按70%胚胎发育至某期的时间计算。

受精率为受精卵发育至囊胚期时, 发育卵占全部上浮卵的百分数, 孵化率为初孵仔鱼数目占受精卵的百分数, 畸形率为胚体形成期发育畸形的胚胎占存活胚胎的百分数。数据分析采用 SPSS 软件, 进行单因素方差分析, 差异显著性水平为 0.05。

2 结果与分析

与很多硬骨鱼胚胎发育类似, 星斑川鲷雌核二倍体胚胎和普通二倍体胚胎发育都经历卵裂期、囊胚期、原肠期、神经胚期、胚体形成期、尾芽期、心跳期、出膜前期和出膜期。杂交胚胎发育到胚体形成期全部死亡, 没有经历尾芽期、心跳期、出膜前期和出膜期; 单倍体胚胎发育到尾芽期全部死亡, 没有经历出膜前期、出膜期。

2.1 卵裂期

星斑川鲷单倍体、雌核二倍体、杂交和普通二倍体胚胎的卵裂方式均为局部盘状卵裂, 其受精卵都是在受精后 30 min 形成胚盘, 随后受精卵开始等分裂, 经过 2 细胞(图 1a, 图 2a)、4 细胞(图 1b)、8 细胞(图 1c)、16 细胞(图 1d)、32 细胞(图 1e, 图 3a)、64 细胞(图 1f)、128 细胞期(图 1g)的不断分裂, 进入多细胞期。在此阶段雌核二倍体胚胎、单倍体胚胎、杂交胚胎与普通胚胎发育形态相似, 普通胚胎和单倍体发育速度较快, 均为 10 h 35 min, 雌核发育胚胎和杂交胚胎发育较慢, 分别为 10 h 40 min 和 10 h 45 min (表 1)。

2.2 囊胚期

卵裂期后, 胚胎细胞继续分裂、膨胀, 细胞球变得越来越小和密集, 类似桑葚状, 进而细胞团在卵内形成圆饼状隆起, 为高囊胚期(图 1h)。这一时期

单倍体胚胎、雌核二倍体胚胎、杂交胚胎和普通二倍体胚胎的形态无明显差异, 普通二倍体的发育速度依然较快, 雌核发育胚胎较慢, 发育时间差为 15 min。随着发育的进行, 高囊胚期已经无法在显微镜下区分细胞, 圆饼状隆起逐渐沿卵黄囊表面向四周扩散和下包, 与卵黄囊交界处坡度变得平缓, 进入低囊胚期(图 1i, 图 2b, 图 3b)。此期单倍体胚胎、雌核二倍体胚胎、杂交胚胎和普通二倍体胚胎在形态上没有明显区别。从受精后发育到低囊胚期, 雌核发育二倍体胚胎需要 16 h 25 min, 单倍体胚胎 16 h 5 min, 杂交胚胎 16 h 15 min, 普通二倍体胚胎 15 h 55 min, 低囊胚各实验组发育速度由快到慢依次为: 普通二倍体胚胎、单倍体胚胎、杂交二倍体胚胎、雌核发育二倍体胚胎。

2.3 原肠期

低囊胚期后, 胚胎细胞开始沿卵黄表面继续向下扩展, 进入原肠期(图 1j)。随着囊胚层细胞向四周继续下包, 出现内、外胚层的分化, 在囊胚层边缘形成增厚细胞形成胚环(图 1k), 随着细胞的继续分裂, 囊胚层向下扩展(图 1l), 同时在胚环一侧胚层细胞逐渐隆起, 在原肠一侧形成舌状的胚盾(图 1m)。胚盘继续下包, 在胚盘下包 3/5 时, 胚盾拉长(图 1n), 胚盘继续下包 4/5 时, 形成一圆形胚孔, 胚盾开始拉伸, 胚体初现(图 1o), 此阶段, 普通二倍体和雌核发育二倍体胚胎在形态上没有明显差异, 而杂合二倍体和单倍体胚胎的胚环较单薄, 杂合二倍体胚层浑浊不清, 分散有许多不规则的分裂球(图 3c)。各组发育速度由快到慢依次为普通二倍体胚胎、杂交二倍体胚胎、单倍体胚胎、雌核发育二倍体胚胎。

2.4 神经胚期

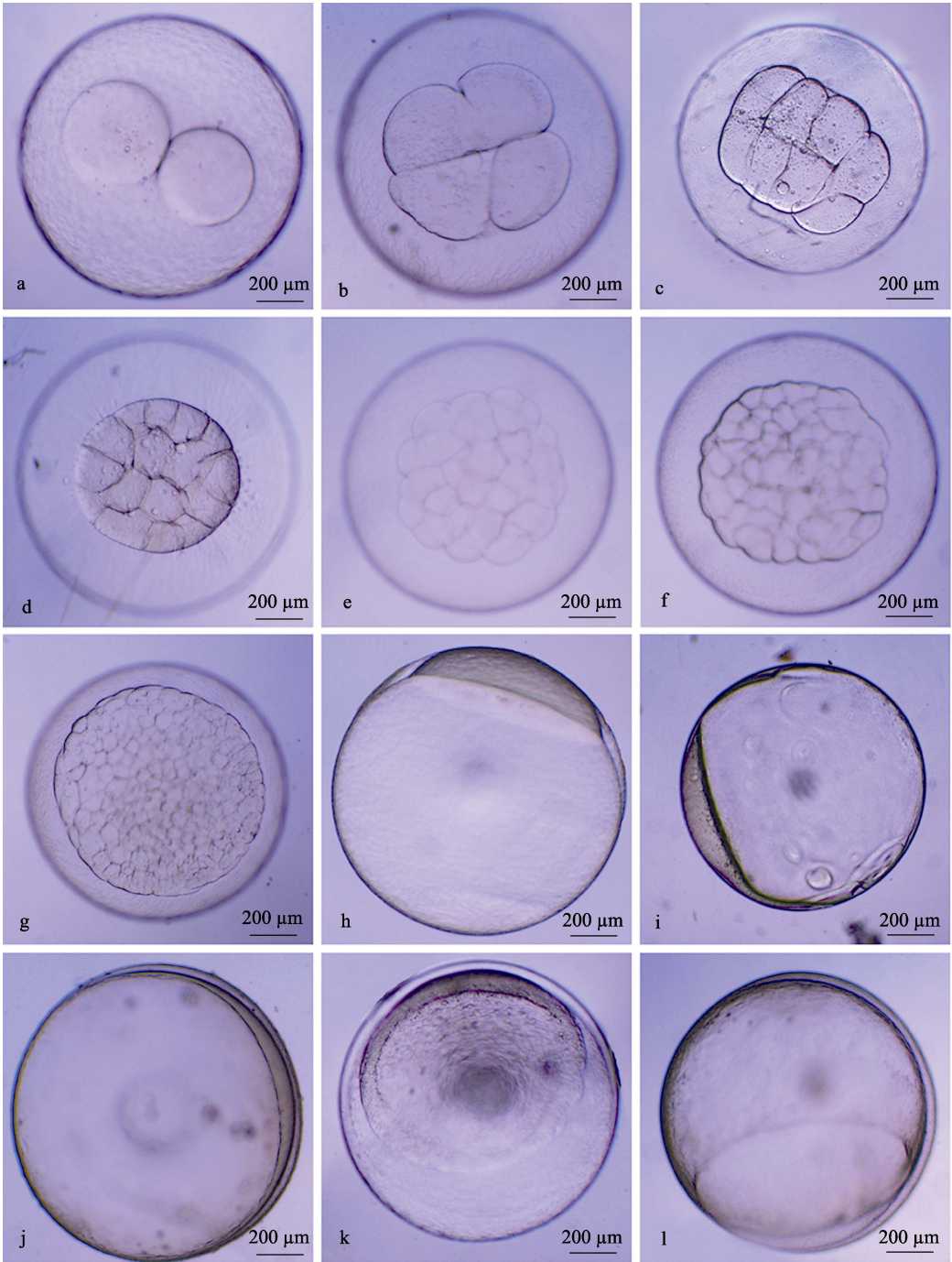
随着胚体的不断伸展, 胚盾拉伸变细而长, 胚体结构分化, 可见中心神经管, 形成比较清晰的胚体雏形(图 1n, 1o, 1p), 进入神经胚期。神经胚期侧面观察, 雌核发育二倍体胚胎和普通二倍体胚胎头部区比尾部宽而厚, 胚胎原基似蝌蚪状, 头突出现, 神经胚晚期胚层几乎包被整个卵黄囊(图 1o), 胚孔开始闭合(图 1p), 胚体尾部原基出现。杂合二倍体胚体雏形非常模糊, 多数胚盘下包至 1/2 处时, 胚体雏形仍不能准确分辨(图 3d), 胚体组织分散, 无法聚拢, 出现很多的畸形胚胎(图 3e); 单倍体胚胎的胚孔可见, 但胚体短小弯曲, 出现大量畸形。此阶段

各组发育速度由高到低依次为普通二倍体胚胎、单倍体胚胎、杂合二倍体胚胎、雌核发育二倍体胚胎,发育时间差达到 75 min。

2.5 胚体形成期

雌核发育胚胎和普通二倍体胚胎均可正常发育至胚胎形成期,头的两侧突出,1 对视囊和尾部的原基出现,进入胚体形成早期(图 1q)。头部器官不断

分化,胚孔关闭,视泡和听囊明显,肌节在胚体中间出现,胚体神经索发达,随着胚体的延伸出现色素。胚体继续发育,绕卵黄大约 50%,肌节增至 12~14 对,正常胚胎肌节不断增加且明显,色素增多,胚体增厚。单倍体胚胎在胚体形成期发生畸形现象,胚体较短小且弯曲(图 2d),有的胚孔迟迟不能关闭(图 2c),杂交胚胎胚体模糊,各器官不能正



(待续 to be continued)

(续图1 Fig.1 continued)

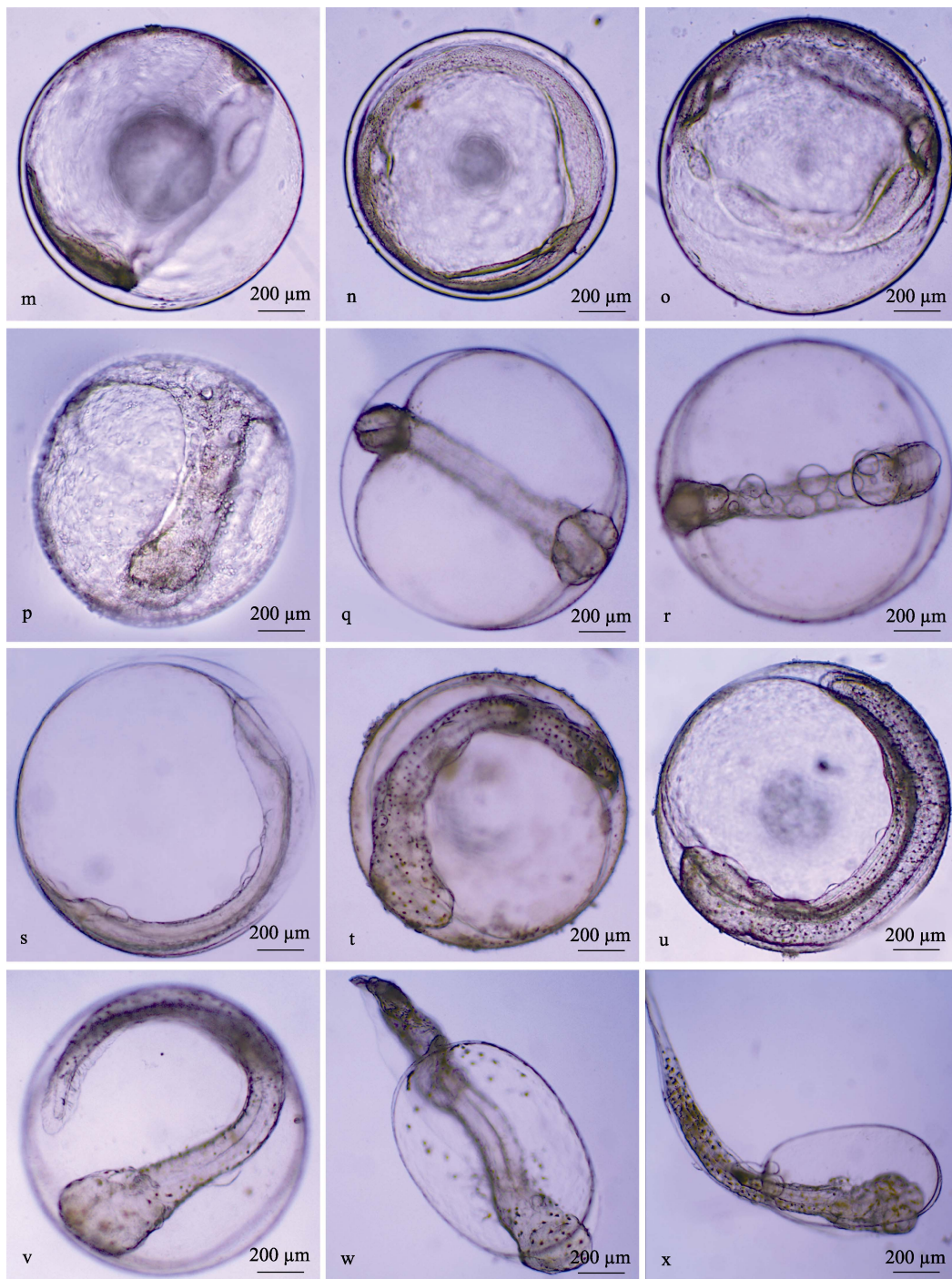


图 1 星斑川鲷雌核发育二倍体胚胎发育过程

a. 2 细胞期; b. 4 细胞期; c. 8 细胞期; d. 16 细胞期; e. 32 细胞期; f. 64 细胞期; g. 128 细胞期; h. 高囊胚期; i. 低囊胚期;
j. 原肠期早期; k. 原肠期早期; l. 原肠中期; m. 原肠后期; n. 神经胚期早期; o. 神经胚期晚期; p. 胚孔期; q. 胚体形成期;
r. 胚体形成期(畸形胚胎); s. 尾芽期; t. 尾芽期(畸形胚胎); u. 心跳期; v. 出膜前期; w. 出膜; x. 出膜 1 d 仔鱼。

Fig. 1 The embryonic development of gynogenetic diploid of *Platicthys stellatus*

a. 2 celled stage; b. 4 celled stage; c. 8 celled stage; d. 16 celled stage; e. 32 celled stage; f. 64 celled stage; g. 128 celled stage;
h. High blastula stage; i. Low blastula stage; j. Early blastula stage; k. Early blastula stage; l. Mid blastula stage;
m. Late blastula stage; n. Early neurula stage; o. Late neurula stage; p. Formation stage of embryo;
q. Formation stage of embryo; r. Formation stage of embryo (abnormal); s. Tail-bud stage; t. Tail-bud stage (abnormal);
u. Heart beating stage; v. Prehatching stage; w. Hatching stage; x. Newly hatched larvae 1 day.

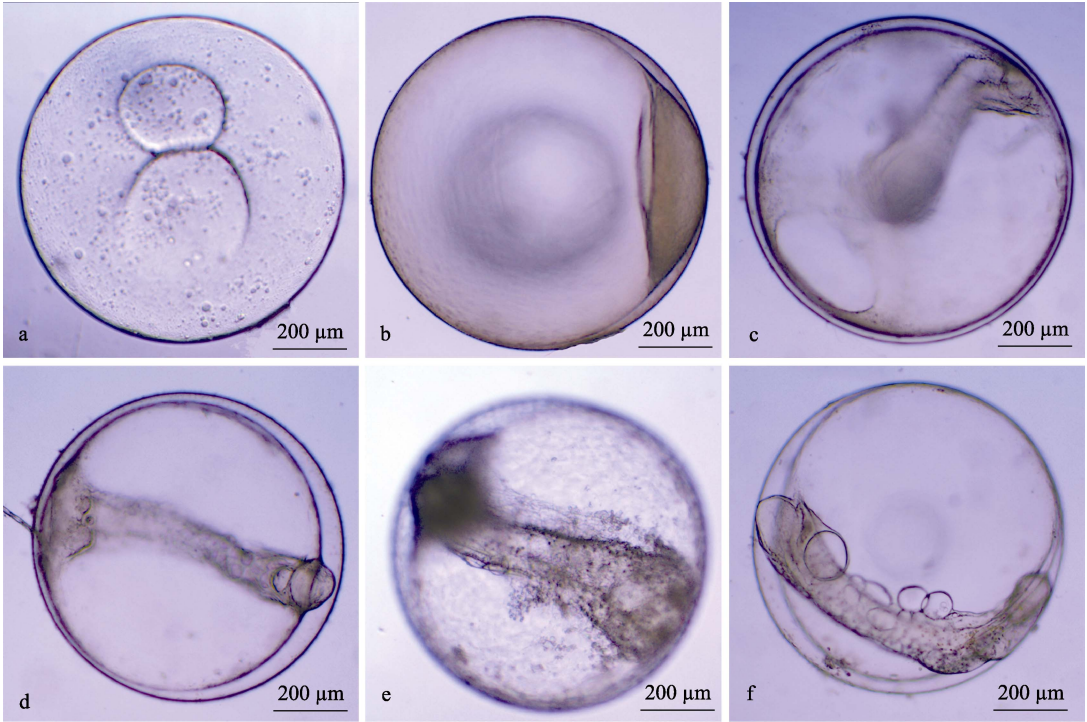


图 2 星斑川鲮单倍体胚胎发育过程
a. 卵裂期; b. 囊胚期; c. 胚体形成期(畸形胚胎); d. 胚体形成期(畸形胚胎); e. 尾芽期(畸形胚胎); f. 尾芽期(畸形胚胎).

Fig. 2 The embryonic development of haploid of *Platichthys stellatus*
a. Cleavage period; b. Blastocyst stage; c. Formation stage of embryo (abnormal);
d. Formation stage of embryo (abnormal); e. Neurula stage (abnormal); f. Tail-bud stage (abnormal).

表 1 星斑川鲮雌核发育、单倍体、杂交胚胎和正常发育胚胎发育时序
Tab. 1 Time table of embryonic development of gynogenetic diploid, haploid,
crossing and normal diploid of *Platichthys stellatus*

胚胎发育时期 stage of embryonic development	雌核二倍体 gynogenesis	单倍体 haploid	杂交胚胎 hybridization	普通二倍体 diploid	图版 plate
2 细胞 two celled	1 h 50 min	1 h 50 min	1 h 55 min	1 h 50 min	图 1 a, 图 2 a
4 细胞 four celled	2 h 25 min	2 h 20 min	2 h 30 min	2 h 25 min	图 1 b
8 细胞 eight celled	3 h 20 min	3 h 15 min	3 h 20 min	3 h 15 min	图 1 c
16 细胞 sixteen celled	4 h 50 min	4 h 40 min	4 h 50 min	4 h 45 min	图 1 d
32 细胞 thirty-two celled	6h 45min	6 h 40 min	6 h 50 min	6 h 45 min	图 1 e, 图 3 a
64 细胞 sixty-two celled	8 h 5 min	7 h 50 min	8 h 5 min	7 h 55 min	图 1 f
128 细胞 multicelled	10 h 40 min	10 h 35 min	10 h 45 min	10 h 35 min	图 1 g
高囊胚 high blastula	12 h 5 min	11 h 55 min	11 h 55 min	11 h 50 min	图 1 h
低囊胚 low blastula	16 h 25 min	16 h 5 min	16 h 15 min	15 h 55 min	图 1 i, 图 2 b, 图 3b
原肠期 gastrula	19 h 20 min	18 h 55 min	18 h 30 min	17 h 50 min	图 1 j k l m, 图 3 c
神经胚期 neurula	27 h 40 min	26 h 45 min	27 h 10 min	26 h 25 min	图 1 n o p, 图 3 d e
胚体形成期 embryogenesis	43 h 20 min	44 h 10 min	44 h 20 min	41 h 40 min	图 1 q, 图 2 c d, 图 3 f
尾芽期 tail bud	84 h 20 min	89 h 50 min	—	80 h 10 min	图 1 r s t, 图 2 e f
心跳期 heart beating	90 h 5 min	—	—	85 h 20 min	图 1 u
出膜前期 prehatching	104 h 5 min	—	—	99 h 55 min	图 1 v
出膜期 hatching	104 h 50 min	—	—	100 h 10 min	图 1 w

常辨认(图 3f), 在胚体形成期下沉死亡, 不能继续发育。各组发育速度由快到慢依次为普通二倍体胚胎、雌核发育二倍体胚胎、单倍体胚胎、杂合二倍体胚胎, 普通胚胎较雌核发育胚胎快 160 min。

2.6 尾芽期

雌核发育二倍体胚胎和普通二倍体胚胎肌节数量不断增加, 尾部出现一球状克氏囊(图 1s), 胚胎的尾端逐渐变长, 向一侧弯曲, 胚体头部结构更加清晰, 晶体、耳石出现; 随着胚体的继续延伸, 胚胎增厚, 心脏尚未搏动(图 1s); 身体有点状黑色素分布。与普通二倍体相比, 雌核发育胚胎在此阶段形态发育没有明显差异, 但出现部分畸形胚胎(图 1r, 1t), 胚胎失去浮力, 下沉死亡。单倍体胚体浑浊且已经看不清明显的界限(图 2e), 胚体头部、尾部、躯干出现畸形, 胚体组织不能完全聚拢, 在胚体两侧扩散, 并且有大型的球状组织(图 2f), 单倍体胚胎至此停止发育。各组发育速度由快到慢依次为普通二倍体胚胎、雌核发育二倍体胚胎、单倍体胚胎, 普通胚胎较雌核发育胚胎快 250 min。

2.7 心跳期

雌核发育二倍体胚胎及普通二倍体胚胎的尾端

继续伸长, 胚体包卵黄囊大约 3/5, 心包突起, 听囊清晰可见, 尾鳍褶开始出现(图 1u)。胚体出现间歇性抖动, 随之心脏开始跳动, 在心脏前后可见血液流动。部分雌核发育二倍体胚胎出现颜色暗淡, 表面模糊甚至胚胎浑浊, 胚胎下沉死亡。普通胚胎发育速度明显快于雌核发育二倍体, 发育速度快 285 min。

2.8 出膜前期

雌核发育和普通二倍体胚胎的胚体继续延伸, 尾部接近头部, 绕卵黄大约一周, 尾鳍褶清晰, 分布于尾部两侧, 胸鳍褶呈半圆形位于体前部两侧(图 1v), 心脏跳动节律性强。与普通二倍体相比, 部分雌核发育二倍体出现尾上翘、脊柱弯曲。普通二倍体胚胎发育速度较雌核发育二倍体胚胎快 250 min。

2.9 出膜期

雌核发育二倍体和普通二倍体胚胎体色透明, 尾鳍褶上的色素丛明显, 胚体出现间歇性转动。卵膜破裂, 胚胎以头部或尾部先出膜(图 1w)。雌核发育二倍体和普通二倍体出膜期的胚体形态没有明显差异。普通二倍体胚胎孵化时间为 100 h 10 min, 雌核发育胚胎孵化时间为 104 h 50 min, 时间差为 280 min。

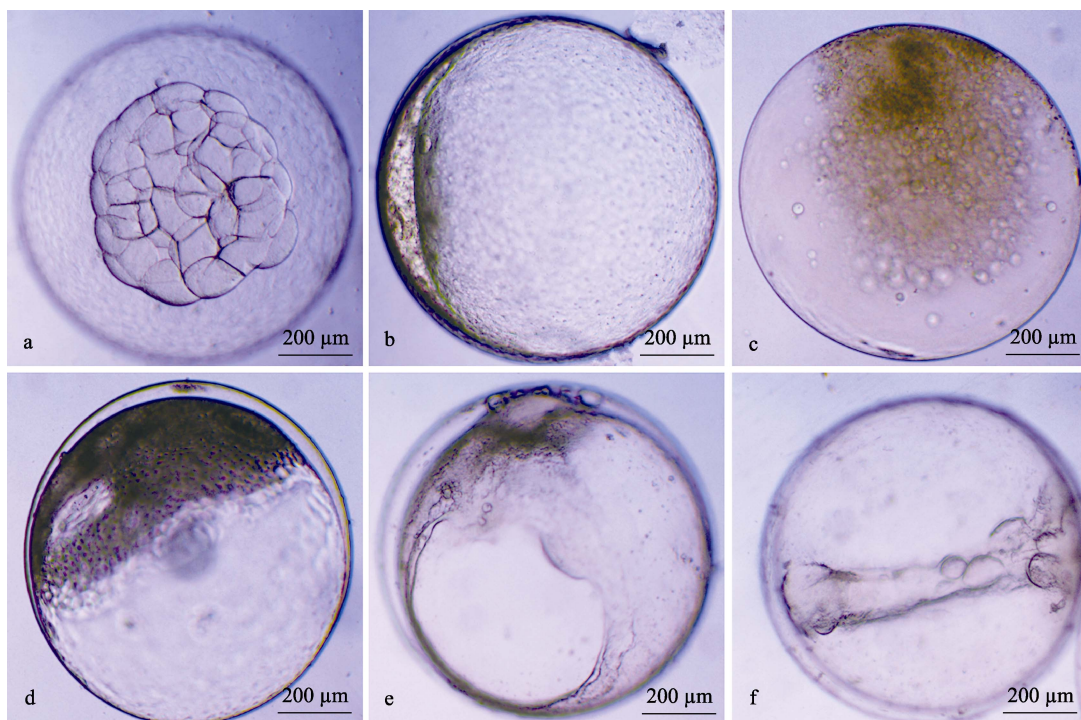


图3 星斑川鲮杂交二倍体胚胎发育过程

a. 卵裂期; b. 囊胚期; c. 原肠期(畸形胚胎); d. 神经胚期(畸形胚胎); e. 神经胚期(畸形胚胎); f. 胚体形成期(畸形胚胎)。

Fig. 3 The embryonic development of hybrid diploid of *Platichthys stellatus*

a. Cleavage period; b. Blastocyst stage; c. Gastrula stage (abnormal); d. Neurula stage (abnormal);

e. Neurula stage (abnormal); f. Formation stage of embryo (abnormal).

2.10 初孵仔鱼

初孵仔鱼大部分漂浮在水面,卵黄囊覆盖在上面,尾巴由卷曲开始逐渐的伸展,卵黄囊较大呈椭圆形,从吻端延伸至肛门,约占体长的 1/2。大约 3 min 后出现间歇性转动。镜下可见心脏有力地跳动,体液在血管和卵黄囊表面毛细管中流动,眼色素加深。出膜后 1 d 鱼苗,卵黄囊呈鸡蛋型前大后小(图 1x),卵黄囊的后端更平滑,头不再完全深入卵黄囊,尾鳍角质鳍条出现。普通二倍体的仔鱼和雌核发育二倍体的仔鱼外形没有明显区别。

2.11 胚胎发育统计

从表 2 可见,单倍体胚胎、杂交二倍体胚胎和雌核发育二倍体胚胎的受精率与普通二倍体胚胎均没有显著差异($P>0.05$)。单倍体和杂交二倍体的胚体畸形率很高,分别为 $(81.96\pm 9.17)\%$ 、 $(82.67\pm 9.96)\%$,与雌核发育胚胎畸形率差异显著($P<0.05$),普通二倍体胚胎发育的畸形率最低 $(35.11\pm 6.19)\%$ 。普通二倍体胚胎孵化率可达到 $(58.01\pm 5.30)\%$,雌核发育胚胎的孵化率仅为 $(0.11\pm 0.01)\%$,与普通二倍体差异显著($P<0.05$)。单倍体和杂交二倍体的孵化率均为 0。

表 2 各试验组星斑川鲈受精率、畸形率和孵化率
Tab. 2 The fertilization rate, abnormality rate and hatching rate of each *Platichthys stellatus* group

实验组 experimental group	受精率/% fertilization rate	畸形率/% abnormality rate	孵化率/% hatching rate
普通二倍体 diploid	94.31±0.51 ^a	35.11±6.19 ^a	58.01±5.30 ^a
单倍体 haploid	85.14±1.60 ^a	81.96±9.17 ^c	0±0 ^b
杂交 hybridization	83.84±2.31 ^a	82.67±9.96 ^c	0±0 ^b
雌核发育 gynogenesis	89.77±6.89 ^a	53.59±0.36 ^b	0.11±0.01 ^b

注: 同列标注不同字母表示组间差异显著($P<0.05$)。
Note: The data in the same column with different little letters are significantly different at the 0.05 level.

3 讨论

人工诱导雌核发育是利用物理、化学或生物学方法使精子遗传物质失活,使失活精子与正常卵子“受精”,再通过抑制第二极体排放或第一次卵裂的方法,使胚胎染色体加倍从而发育成雌核二倍体^[19]。雌核发育技术是鱼类遗传性别鉴定、性别控制、染色体操作育种常用方法,近年来在牙鲆全雌育种研究中得到了充分的利用^[20]。星斑川鲈雌雄鱼在生长上具有显著的差异,利用冷冻保存的异源精子诱导其雌核发育,建立雌核发育群体,对于星斑川鲈全雌育种具有重要的意义,但是对异源精子“受精”后发育生物学和细胞生物学等方面的研究还有待进一步深入。异源精子在雌核发育诱导具有重要的作用,在大菱鲆^[5]、半滑舌鳎^[21]、漠斑牙鲆^[22]等鱼类的雌核发育诱导研究中,使用冷冻保存的鲈鱼精子,证明冷冻保存的鲈鱼精子经过紫外线灭活后能诱导鲆鲈鱼类雌核发育。但由于紫外线照射量、压力处理大小和处理时间等因素的影响,导致在后代中可能产生单倍体胚胎、杂交胚胎,将影响到雌核发育后代建立的可靠性。因此对雌核发育诱导过程中产生的单倍体胚胎、杂交胚胎、雌核发育胚胎和普通胚胎的发育进行比较研究,对雌核发育后代进行鉴别

具有重要意义。之前对于海水硬骨鱼类不同倍性胚胎发育的比较研究很少,仅刘海金等对牙鲆单倍体、三倍体、雌核发育二倍体和普通二倍体胚胎发育进行了比较研究^[23]。关于星斑川鲈的杂交育种,王波等对星斑川鲈胚胎发育^[8]及星斑川鲈与圆斑星鲈、条斑星鲈杂交胚胎^[17]的发育进行了研究,目前尚未见星斑川鲈雌核发育、单倍体、及与鲈鱼杂交胚胎发育相关的研究报道。

本研究表明,雌核发育二倍体与普通二倍体胚胎在发育形态上无明显差异,除进入原肠期后发育速度较慢外,发育过程基本相同,但发育过程中畸形胚胎比例显著提高。分析原因可能是雌核发育胚胎经静水压处理,由于静水压力过大或压力持续时间较长,致使部分胚胎代谢缓慢或完全停止,从而影响其发育。牙鲆雌核发育二倍体胚胎的发育也出现发育滞后的现象^[23]。Johnson 等^[24]研究认为,压力刺激干扰了受精卵细胞 mRNA 表达模式和蛋白质功能,导致部分胚胎无法按正常途径发育从而影响了胚胎发育的进程和存活。

星斑川鲈单倍体胚胎发育至低囊胚期开始出现明显滞后,且胚胎在原肠期时下包没有规则,胚孔很大,随着胚胎发育的继续,胚盾及后期发育成的胚体短小,包被胚胎的程度不够,表现出明显的畸

形症状。胚孔闭合的时间较长,肌节不明显,晶体轮廓模糊,头部组织难以分辨,形成的胚体躯体短粗、脊柱弯曲,头、躯干、尾三者比例失常,星斑川鲷单倍体胚胎发育至尾芽期全部死亡。大菱鲆单倍体从囊胚期开始胚胎发育速度明显慢于普通二倍体胚胎,胚体形态上胚环比较单薄,胚体较模糊,边缘不规则,孵出个体头大、尾小,脊柱弯曲,孵出后很快死亡^[25];牙鲆单倍体从原肠期开始发育速度一直慢于普通二倍体胚胎,胚胎出现胚体雏形时,胚体较模糊,胚体形成过程中比较短小,畸形率高。少数个体可存活至孵化期,活力较差,在胚后阶段全部死亡^[23]。半滑舌鲷单倍体从囊胚期开始发育速度明显滞后于普通二倍体,胚体形态上出现胚体短小,周围弥散,头部组织不能分辨,在出膜前期胚胎全部死亡^[4]。大鳞副泥鳅(*Paramisgurnus dabryanus*)^[26]雄核发育单倍体、泽蛙(*Fejervarya multistriata*)^[27]雌核发育单倍体胚胎发育速度也慢于普通二倍体,单倍体胚胎发育过程出现体短、躯干畸形等单体综合征。朱作言^[28]认为单倍体胚胎低囊胚期后发育速度出现差异,可能是由于在胚胎发育的初始阶段的卵裂期,发育受母本 mRNA 和蛋白质控制,从囊胚期开始细胞分化和器官分化由胚胎细胞基因调控,而单倍体胚胎中只含有单套染色体组,不能完全行使胚胎发育过程所需的正常基因调控,从而导致胚胎发育滞后和胚胎畸形现象。

对于星斑川鲷与其他鲆鲷鱼类杂交胚胎的发育有不少研究报道,例如,条斑星鲷与星斑川鲷杂交、星斑川鲷与圆斑星鲷杂交胚胎能够发育并孵化出正常的鱼苗,但发育速度均慢于星斑川鲷普通二倍体^[17];石鲷(*Platichthys bicoloratus*)与星斑川鲷的杂交胚胎能孵化出正常鱼苗,发育速度慢于普通二倍体^[29],星斑川鲷与钝吻黄盖鲷(*Pseudopleuronectes yokohamae*)杂交胚胎可发育并孵化出鱼苗,但出膜 48 h 后死亡,发育速度明显慢于普通二倍体类似^[30]。星斑川鲷与鲈冷冻精子杂交实验从未见报道,杂交胚胎油球不明显,大小与普通二倍体为无明显差异,从受精至低囊胚期发育速度与普通二倍体差异不明显。发育至神经胚期杂交胚胎大部分卵下沉,形成的胚体雏形非常模糊,胚体组织分散,胚胎发育过程中出现很多的畸形胚胎,发育至胚体形成期阶段胚胎全部死亡。星斑川鲷染色体为 $2N=48t$,染色体均为端部染色体,染色体臂数 $NF=48$ ^[15],鲈的染色体为 $2N=48t$,染色体为端部染色体,染色体臂数 $NF=48$ ^[31],

两种鱼的染色体数目相等,杂交胚胎在早期可以发育。这可能由于鲈与星斑川鲷隶属于不同目,亲缘关系较远,虽然染色体数目相同,但染色体组型存在较大的差异。孟振等^[25]认为远缘杂交受精后因父母本的远源性,卵子的细胞质不能与精子的 DNA 相协调,无法组装卵子的有丝分裂器导致基因表达调控紊乱,导致胚胎发育速度缓慢,胚体畸形,无法保证胚胎的正常发育。本实验证明利用鲈精子进行遗传物质灭活后诱导星斑川鲷雌核发育,可以完全避免后代中出现杂交胚胎,保证了雌核发育后代的准确性。

本研究利用冷冻保存的鲈精子能够诱导星斑川鲷雌核发育,成功制备了雌核发育二倍体,但孵化率低,鱼苗能够正常发育;利用未灭活的鲈精子与星斑川鲷卵受精得到的杂交胚胎,及灭活鲈精子与星斑川鲷卵受精后单倍体胚胎发育至胚体形成期和尾芽期后停止发育。雌核发育胚胎、单倍体胚胎和杂交胚胎的发育速度都慢于普通胚胎。本研究为星斑川鲷雌核发育提供了技术方法,同时为单倍体、杂交胚胎和雌核发育胚胎的发育生物学研究提供了细胞生物学证据。

参考文献:

- [1] Meng Q W. Systematic of Fishes[M]. Beijing: China Agriculture Press, 1995: 955-970. [孟庆闻. 鱼类分类学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995: 955-970.]
- [2] Wang B, Wang Z L, Sun P X, et al. The breeding condition and development prospects of starry flounder (*Platichthys stellatus* Pallas)[J]. Fishery Modernization, 2006(5): 16-18. [王波, 王宗灵, 孙丕喜, 等. 星斑川鲷的养殖条件及发展前景[J]. 渔业现代化, 2006(5): 17-18.]
- [3] Tian Y S, Li X K, Duan H M, et al. The family lines establishment and genetic effects analysis of the starry flounder[J]. Acta Oceanologica Sinica, 2016, 38(6): 21-31. [田永胜, 李祥孔, 段会敏, 等. 星斑川鲷家系建立及遗传效应分析[J]. 海洋学报, 2016, 38(6): 21-31.]
- [4] Tian Y S, Chen S L, Shao C W, et al. Embryonic development of *Cynoglossus semilaevis* induced by frozen sperm of *Lateolabrax japonicus*[J]. Marine Fisheries Research, 2008, 29(2): 1-9. [田永胜, 陈松林, 邵长伟, 等. 鲈鱼冷冻精子诱导半滑舌鲷胚胎发育[J]. 海洋水产研究, 2008, 29(2): 1-9.]
- [5] Su P Z, Chen S L, Yang J F, et al. Induction of gynogenesis in *Scophthalmus maximus* by heterologous sperms of *Lateolabrax japonicus*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15(5): 715-721. [苏鹏志, 陈松林, 杨景峰, 等. 异源

- 冷冻精子诱导大菱鲆的雌核发育[J]. 中国水产科学, 2008, 15(5): 715-721.]
- [6] Luckenbach J A, Godwin J, Daniels H V, et al. Induction of diploid gynogenesis in southern flounder (*Paralichthys lethostigma*) with homologous and heterologous sperm[J]. Aquaculture, 2004, 237(1-4): 499-516.
- [7] Policansky D, Sieswerda P. Early life history of the starry flounder, *Platichthys stellatus*, reared through metamorphosis in the laboratory[J]. Trans Am Fish Soc, 1979, 108: 326-327.
- [8] Wang B, Liu Z H, Sun P X, et al. The morphological observation on the embryonic development of Starry flounder, *Platichthys stellatus*[J]. Acta Oceanologica Sinica, 2008, 30(2): 130-136. [王波, 刘振华, 孙丕喜, 等. 星斑川鲽胚胎发育的形态观察[J]. 海洋学报, 2008, 30(2): 130-136.]
- [9] Borsa P, Blanquer A, Berrebi P. Genetic structure of the flounders *Platichthys flesus* and *P. stellatus* at different geographic scales[J]. Mar Biol, 1997, 129(2): 233-246.
- [10] An H S, Byun S G, Kim Y C, et al. Wild and hatchery populations of Korean starry flounder compared using microsatellite DNA markers[J]. Int J Mol Sci, 2011, 12(12): 9189-9202.
- [11] An H S, Nam M M, Myeong J I, et al. Genetic diversity and differentiation of the Korean starry flounder (*Platichthys stellatus*) between and within cultured stocks and wild populations inferred from microsatellite DNA analysis[J]. Mol Biol Rep, 2014, 41(11): 7281-7292.
- [12] Ortega-Villaizán Romo M D M, Aritaki M, Suzuki S, et al. Genetic population evaluation of two closely related flatfish species, the rare barfin flounder and spotted halibut, along the Japanese coast[J]. Fish Sci, 2006, 72(72): 556-567.
- [13] Zheng F R, Guo X Y, Liu H Z, et al. cDNA cloning and expression characteristics of MHC II invariant chain in *Platichthys stellatus*[J]. Journal of Fisheries of China, 2016, 40(2): 145-154. [郑风荣, 郭湘云, 刘洪展, 等. 星斑川鲽 MHC II 恒定链 Ii 基因的克隆和表达特性[J]. 水产学报, 2016, 40(2): 145-154.]
- [14] Xu D D, You F, Wang B, et al. Analysis on karyotype of chromosome in starry flounder[J]. Advances in Marine Science, 2008, 26(3): 377-380. [徐冬冬, 尤锋, 王波, 等. 星斑川鲽染色体核型分析[J]. 海洋科学进展, 2008, 26(3): 377-380.]
- [15] Jiang J, Tian Y S, Wang B, et al. Cryopreservation of spermatozoa in starry flounder (*Platichthys stellatus*) and its analysis of the physiological characteristics[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2014, 22(1): 17-26. [姜静, 田永胜, 王波, 等. 星斑川鲽精子冷冻保存与生理特性分析[J]. 农业生物技术报, 2014, 22(1): 17-26.]
- [16] Zheng F R, Xu Z J, Zhang Y Q, et al. Research of antimicrobial activity of immune related tissues from starry flounder[J]. Chinese Fishery Quality and Standaras, 2015, 22(1): 17-26. [郑风荣, 徐宗军, 张永强, 等. 星斑川鲽免疫相关组织抗菌活性的研究[J]. 中国渔业质量与标准, 2015, 22(1): 17-26.]
- [17] Wang B, Liu Z H, Fu M Z, et al. Primary study on the distant hybridization of starry founder (*Platichthys stellatus*)[J]. Fishery Modernization, 2009, 36(5): 41-53. [王波, 刘振华, 傅明珠, 等. 星斑川鲽远缘杂交初步研究[J]. 渔业现代化, 2009, 36(5): 41-53.]
- [18] Tian Y S. Cryopreservation of three marine fish embryos by vitrification[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2004. [田永胜. 三种海水鱼类胚胎玻璃化冷冻保存研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2004.]
- [19] Lou Y D. Artificial gynogenesis and its application in genetics and aquaculture[J]. Journal of Fisheries of China, 1986, 10(1): 111-123. [楼允东. 人工雌核发育及其在遗传学和水产养殖上的应用[J]. 水产学报, 1986, 10(1): 111-123.]
- [20] Liu H J. A breeding method of single cross species of *Paralichthys olivaceus*[P]. Chinese Patent: CN105265354A, 2016-01-27. [刘海金. 一种牙鲆单交种的选育方法[P]. 中国专利: CN105265354A, 2016-01-27.]
- [21] Chen S L, Tian Y S, Yang J F, et al. Artificial gynogenesis and sex determination in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[J]. Mar Biotechnol, 2008, 11(2): 243-251.
- [22] Yang J F, Chen S L, Xu G B, et al. Gynogenetic induction in southern flounder (*Paralichthys lethostigma*) by cryopreserved sperm of *Lateolabrax japonicas*[J]. Journal of Fisheries of China, 2010, 34(8): 1174-1181. [杨景峰, 陈松林, 徐亘博, 等. 花鲈冷冻精子诱导漠斑牙鲆雌核发育[J]. 水产学报, 2010, 34(8): 1174-1181.]
- [23] Liu H J, Wang C A, Zhu X C, et al. Embryonic development of gynogenetic diploid and triploid Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. Journal of Dalian Fisheries University, 2008, 23(3): 161-167. [刘海金, 王常安, 朱晓琛, 等. 牙鲆单倍体、三倍体、雌核发育二倍体和普通二倍体胚胎发育的比较[J]. 大连水产学院学报, 2008, 23(3): 161-167.]
- [24] Johnson R M, Shrimpton J M, Heath J W, et al. Family induction methodology and interaction effects on the performance of diploid and triploid chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*[J]. Aquaculture, 2004, 234(1-4): 123-142.
- [25] Meng Z, Lei J L, Liu X F, et al. Comparative study in embryonic development of different ploidy of turbot, *Scophthalmus maximus*[J]. Periodical of Ocean University of China, 2010, 40(7): 36-42. [孟振, 雷霖霖, 刘新富, 等. 不同倍性大菱鲆胚胎发育的比较研究[J]. 中国海洋大学学报, 2010, 40(7): 36-42.]
- [26] Zhao Z S, Wu Q J, Gao G Q, et al. Study on the development of androgenetic haploid of *Paramisgurnus dabryanus*[J]. Zoological Research, 1999, 20(3): 230-234. [赵振山, 吴清江, 高贵琴, 等. 大鳞副泥鳅雄核发育单倍体胚胎发育的研究[J]. 动物学研究, 1999, 20(3): 230-234.]
- [27] Wu Z Q. The role of a single genome in the development of the gynogenetic haploid of *ranalimnocharis*[J]. Acta Zoologica Sinica, 1985, 31(1): 28-32. [吴仲庆. 单套染色体组

- 在泽蛙雌核单倍体发育中的作用[J]. 动物学报, 1985, 31(1): 28–32.]
- [28] Zhu Z Y. Embryonic development of *Clarias fuscus*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 1982, 7(4): 445–454. [朱作言. 胡子鲶的胚胎发育[J]. 水生生物学报, 1982, 7(4): 445–454.]
- [29] Takeda Y, Tanaka M. Freshwater adaptation during larval, juvenile and immature periods of starry flounder *Platichthys stellatus*, stone flounder *Kareius bicoloratus* and their reciprocal hybrids[J]. J Fish Biol, 2007, 70(5): 1470–1483.
- [30] Zhou J, Wang B, Wang C H. Primary study on induced breeding between *Pseudopleuronectes yokohamae* and *Platichthys stellatus*[J]. Fishery Modernization, 2014, 41(1): 30–34. [周江, 王波, 王长海. 钝吻黄盖鲷×星斑川鲷人工选育初步研究[J]. 渔业现代化, 2014, 41(1): 30–34.]
- [31] Sha Z X, Chen S L, Ye Hanqing, et al. Comparison of several chromosome preparation methods in sea perch *Lateolabrax japonicus*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2003, 10(6): 469–473. [沙珍霞, 陈松林, 叶寒青, 等. 适合花鲈的几种染色体制备方法的比较[J]. 中国水产科学, 2003, 10(6): 469–473.]

Comparison of gynogenetic diploid and haploid embryonic development and hybridization of starry flounder *Platichthys stellatus*

DUAN Huimin^{1,2}, TIAN Yongsheng^{1,3}, LI Wenlong^{1,3}, LI Zhentong^{1,2}, CHEN Zhangfan^{1,3}, TANG Jiang^{1,2}, CHENG Meiling^{1,4}, GUO Hua^{1,2}, SUN Zongzhe⁵, CHEN Songlin^{1,3}

1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;
2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
3. Laboratory for Marine Fisheries, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266273, China;
4. College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China;
5. Penglai Zongzhe Aquaculture Company, Penglai 265617, China

Abstract: Artificially induced gynogenesis is a major technique used for controlling the sex ratio of aquatic animals as well as for culturing selectively bred colonies. In this study, cryopreserved sperm of Japanese seabass *Lateolabrax japonicus* was UV-irradiated and used to fertilize eggs of starry flounder *Platichthys stellatus* and diploid gynogenesis was induced using cold and hydrostatic pressure shocks. Meanwhile, *P. stellatus* eggs fertilized with UV-irradiated *L. japonicus* sperm but without cold or hydrostatic pressure shock were used as the haploid group; *P. stellatus* eggs fertilized with *L. japonicus* sperm were used for hybridization; and *P. stellatus* eggs fertilized with *P. stellatus* sperm were used as a control group. The results showed that cell division started at a similar point in time in the control group as in the gynogenetic haploids and hybridized embryos. However, as compared with the controls, embryonic development among each of the three experimental groups was retarded from the late blastula stage. All the hybridized embryos died before formation of an embryonic body; all the haploid embryos died before the heart started to beat. Thus, none of the embryos in these two groups could be successfully hatched. Embryonic development of a small portion of the gynogenetic diploids followed a pattern resembling that of the controls, although with less success: (58.01±5.30)% of embryos in the control group were hatched out at 100 h 10 min, with (35.11±6.19)% malformed; in comparison, only (0.11±0.01)% of the gynogenetic diploids were hatched out at 104 h 50 min, with (53.59±0.36)% malformed. Although the gynogenetic diploids had a very low hatching rate and a relatively high rate of malformation, we were still able to construct a gynogenetic colony of *P. stellatus* with normally developing larvae. Hence, we propose that this study uncovers a promising technique for *P. stellatus* gynogenesis, and the results provide abundant cytobiological evidence contributing to information on the developmental biology of haploid, hybridized, and gynogenetic embryos of this species.

Key words: *Platichthys stellatus*; gynogenesis; haploid; hybrid embryo; embryonic development

Corresponding author: TIAN Yongsheng. E-mail: tianys@ysfri.ac.cn